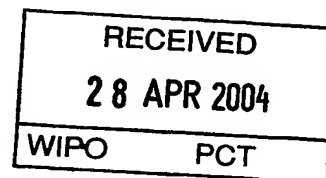


证 明



本证明之附件是向本局提交的下列专利申请副本

申 请 日： 2003. 04. 09

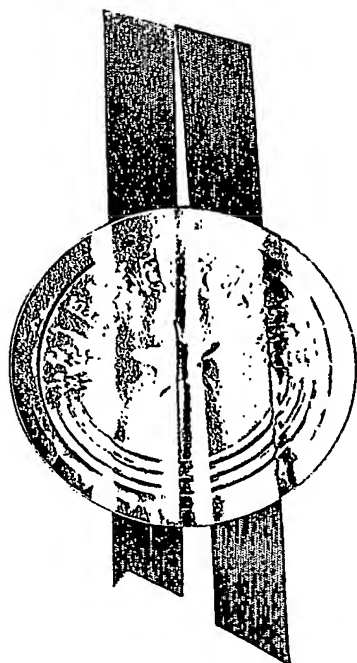
申 请 号： 03109622. 0

申 请 类 别： 发明专利

发 明 创 造 名 称： 血红蛋白—人血清蛋白偶联物制备血液代用品及其
制备方法

申 请 人： 中国科学院过程工程研究所

发明人或设计人： 苏志国、路秀玲、郑春杨、徐宇红、胡涛



**PRIORITY
DOCUMENT**
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

中华人民共和国
国家知识产权局局长

王景川

2004 年 04 月 05 日

BEST AVAILABLE COPY

权利要求书

1. 一种蛋白质的偶联物，其特征是血红蛋白与人血清白蛋白的偶联物。
2. 权利要求1所述的偶联物，其特征是血红蛋白数目为1~3个，人血清白蛋白数目为1~3个。
3. 权利要求1所述的偶联物，其特征是血红蛋白数目为1~2个，人血清白蛋白数目为1~2个。
4. 权利要求1所述的偶联物，其特征是血红蛋白数目为1个，人血清白蛋白数目为1个。
5. 权利要求1~4中任一权利要求所述的偶联物，其特征是偶联产物分子量分布在100KD~300KD之间。
6. 权利要求1~4中任一权利要求所述的偶联物，其特征是血红蛋白是分子内交联的血红蛋白。
7. 权利要求1中所述偶联物的制备方法，其中血红蛋白的制备方法是将膜过滤和离子交换层析集成纯化血红蛋白，步骤如下：
 - 1) 用0.22~0.65 μ m膜微滤，得到的透过液经10~30KD膜超滤；
 - 2) 超过滤后的血红蛋白浓缩液经透过式阴离子交换层析，层析pH值为7.0~7.8，缓冲液浓度为10mM~50 mM，采用PEG伴随式层析，选择PEG400~PEG4000，浓度为0.25%~10%，操作温度为4~10℃。
8. 权利要求1中所述偶联物的制备方法，是指在液相中将两种蛋白质直接与交联剂反应的一步偶联法，或者先修饰一种蛋白质再偶联另外一种蛋白质的两步偶联法，或者将蛋白质吸附在固相介质上进行偶联的方法，采用的偶联剂为与蛋白质氨基、巯基或羟基反应的双功能交联剂。
9. 权利要求1中所述偶联物的制备方法，其中偶联产物经过离子交换层析、超过滤以及凝胶过滤层析纯化，除去未发生偶联反应及分子量大于300KD和小于100KD的成分。
10. 权利要求1中所述的偶联物用作血液代用品的用途。

说明书

血红蛋白-人血清白蛋白偶联物 制备血液代用品及其制备方法

技术领域

本发明涉及一种血液代用品，尤其涉及以血红蛋白为基质的血液代用品研究领域。

背景技术

输血对于临床手术、抗灾和战场救护是不可缺少的医疗手段。靠人献血不仅面临血源短缺问题，而且由于血型复杂，输血必须进行严格的配型，同时血液要低温储存，保存期短，运输不便，更为严重的是肝炎、艾滋病等病毒的污染使输血安全受到威胁。近年来，血液需求量不断提高，而安全有效的血源却日益紧缺。因此，近几十年来人血液代用品一直是国际科学界和企业界关注的研究开发热点。

人血液代用品 (human blood substitutes)，即人红细胞代用品 (human red cell substitutes)，是具有氧传递功能、维持血液渗透压和酸碱平衡及扩充容量的人工制剂。理想的血液代用品要求具有天然红细胞的传递氧功能、生物相容性、安全性和稳定性。其具有广泛的应用前景，不仅能用于和平时期和战争时期用于临床外科、急性贫血、和大量出血的治疗之外，也可用于各种疾病的治疗，如围术期常规使用、创伤治疗、血液稀释、局部缺血组织的灌流、败血症休克、多种抗体病人、肿瘤治疗等。

现有的人血液代用品主要包括有机化学合成的高分子全氟碳化合物类和生物技术制备的血红蛋白类及红细胞类血液代用品。其中由于全氟碳化合物不具备天然血红蛋白的生物学载氧特性，其研究与开发已不再是重点；通过血型转换成的红细胞具有贮存期短、不易运输等缺点，其研究与应用也受到极大的限制；而来源于红细胞本身的血红蛋白 (Hb) 具有高效的载氧能力和维持胶体渗透压的功能，当前各国都将研制以血红蛋白为基质的携氧剂作为主攻方向，主要包括化学修饰血红蛋白以及脂质体包封血红蛋白和其它包含血红蛋白的微胶囊 (Winslow RM.

Hemoglobin-based red cell substitute. The John Hopkins University Press, Baltimore and London. 1992: 39).

无基质血红蛋白在体内易氧化或解离成单体和二聚体而引起肾毒性, 并且存在氧亲和性高、循环半寿期短、胶体渗透压高等缺陷, 采用化学修饰法实现血红蛋白分子内交联并提高血红蛋白分子量可在一定程度上解决这些问题。分子内交联增强了四聚体的稳定性, 提高血红蛋白的分子量可使其不易直接透过肾而被循环代谢掉, 从而延长其在体内的循环半寿期。但并非所有的化学偶联均能降低血红蛋白的免疫原性。因此修饰要求一方面提高血红蛋白分子量, 消除产品在体内代谢过程中的肾毒性副作用, 另一方面修饰还要保持血红蛋白的生物学活性, 消除产品的免疫原性。目前常用的几种血红蛋白修饰方法有血红蛋白自身聚合 (Rausch C W, Gawryl M S, Light W R et al. Stable polymerized hemoglobin blood-substitute. EP1093720. 2001-04-25), 血红蛋白表面修饰大分子多聚物如 PEG (Davis F, NHO K, ZALIPSKY S. Chemically modified hemoglobin as an effective, stable non-immunogenic red blood cell substitute. US 5234903. 1993-08-10), 以及血红蛋白与多糖或蛋白偶联 (Adamson G J. Hemoglobin-polysaccharide conjugates. US 6500930. 2002-11.31)

虽然目前所研制的血液代用品很少具有天然血液的缺点, 但还没有一种血液代用品具有血液的全部优点。就目前的研究水平看, 血液代用品仍存在许多问题尚未解决, 其中重要的是血液代用品的安全性和有效性等问题。血液代用品存在一些副作用 (如血管收缩和高血压) 限制了它们的应用, 特别是用于有各种疾病的老年人身上。其次是产品在体内循环中存留时间短 (短则几小时, 最长寿命为 70 几小时, 而天然红细胞的寿命则为 120 天), 只能提供短期的供氧功能, 且与正常的血液功能差距较大。

人血清白蛋白 (HSA) 分子量 67,000, 是血浆的主要蛋白质, 在人体内具有维持血液渗透压和携带血液中多种配基 (包括脂肪酸、氨基酸、类固醇、金属离子及药物) 与组织进行交换等生理功能, 医疗上作为重要的临床药物用于手术输血和危重病人补液。将血红蛋白与人血清白蛋白偶联制备血液代用品的优势非常明显。一方面, 血红蛋白是主要的载氧蛋白质, 白蛋白能够维持血液渗透压, 运输营养物质,

7

携带胆红素等积累性毒性物质从而具有解毒功能，因此该新型血液代用品与现有的血液代用品相比，将具有更完全的血液的功能。另一方面，偶联人血清白蛋白大大增加血红蛋白的分子量，同时进行的分子内交联可增强四聚体的稳定性，并且 HSA 在体内显负电性，由于电荷作用不易透过膜，这样更进一步延长了偶联物在体内的循环半寿期。并且更容易形成分子量较均一的交联产物，避免多聚体的聚集，消除肾毒副作用。更重要的是，不同于其它动物的血清白蛋白，来源于人的血清白蛋白不会产生免疫原性，若与动物血红蛋白偶联，还会在很大程度上减弱或消除异体的血红蛋白输入人体内造成的免疫原性。因此本发明采取来自于人或猪、牛、马、羊、狗等动物的血红蛋白与人血清白蛋白偶联的方式，制备一种安全有效的新型血液代用品。

发明内容

本发明提供了一种血红蛋白与人血清白蛋白的偶联物及其制备方法。

本发明偶联物的血红蛋白来自于人或其它哺乳动物，优选为猪、牛、羊、马、狗的血红细胞。偶联物中血红蛋白数目为 1~3 个，优选为 1~2 个，人血清白蛋白数目为 1~3 个，优选为 1 个。偶联物中血红蛋白是分子内交联或未分子内交联的血红蛋白，优选为分子内交联的血红蛋白。偶联产物分子量分布在 100KD~300KD 之间。该偶联物用作血液代用品具有载氧、维持渗透压及运输营养成分的较完全的血液的功能。

本发明提供的偶联物的制备方法，包括无基质血红蛋白的制备、血红蛋白与人血清白蛋白的偶联以及偶联产物的纯化。

将膜过滤和离子交换层析集成纯化血红蛋白，可以得到电泳纯或色谱纯无基质血红蛋白。将洗净的红细胞在低渗透压下溶胀破裂 (Doczi J. Injectable stroma free hemoglobin and its method of manufacture. 1976, US 3991181)，得到的红细胞裂解液经 0.22~0.65 μm 膜微滤，再经 10~30KD 膜超过滤，优选为 0.45 μm 膜微滤，再经 30KD 膜超过滤进行预处理。所得血红蛋白溶液经透过式阴离子交换层析进一步纯化，层析介质优选为 DEAE Sepharose Fast Flow、QMA Spherosil LS、Q Sepharose Big Beads (Amersham pharmacia, Sweden)，层析采用 pH 值为 6.6~8.5，优选为 pH 值为 7.0~7.8 的磷酸缓冲液，

缓冲液浓度为 10mM~100mM, 优选为 20~50 mM。采用 PEG 伴随式层析, 选择 PEG400~PEG4000, 浓度为 0.25%~10%, 优选为 0.5~5%, 层析的回收率大于 95%。纯化各单元的操作温度为 4~10℃。得到用于与人血清白蛋白交联。

本发明采用的偶联剂为与蛋白质氨基、巯基或羟基反应的双功能交联剂, 优选为带有醛基、琥珀酰亚胺 (NHS) 基团、环氧基团、马来酰亚胺基团、亚胺酸酯基团的同型或异性双功能交联剂。

本发明的人血清白蛋白与血红蛋白偶联方法, 包括液相一步偶联法和两步偶联法, 还包括将蛋白质吸附在固相介质上进行偶联的方法。

一步偶联方法: 将蛋白质溶于 pH6~12, 优选为 pH7.5~9.5 的磷酸、HEPES、硼酸、硼砂-氢氧化钠或碳酸钠缓冲溶液中, 蛋白质浓度为 1~150mg/ml, 优选蛋白质浓度为 10~100 mg/ml, 加入交联剂, 交联剂与蛋白质的配比为 3: 1~600: 1, 优选为 10: 1~200: 1, 控制反应温度 4~55℃, 优选为 25~37℃, 反应时间 0.1~48 小时, 优选为 0.5~10 小时。

两步交联方法: 先活化血红蛋白或先活化人血清白蛋白, 将其溶于 pH6~12, 优选为 pH7.0~9.5 的磷酸、HEPES、硼酸、硼砂-氢氧化钠或碳酸钠缓冲溶液中, 蛋白质浓度为 1~150mg/ml, 优选蛋白质浓度为 5~60 mg/ml, 控制反应温度 4~55℃之间, 优选为 25~37℃, 加入交联剂, 交联剂与蛋白质的配比为 3: 1~600: 1, 优选为 10: 1~500: 1, 反应时间 0.1~48 小时, 优选为 0.5~10 小时。交联剂与血红蛋白或人血清白蛋白的活性基团反应 (该活性基团可以为巯基或氨基) 后, 过 Sephadex G~25 脱盐柱或低温透析脱修饰剂, 同时调节缓冲液 pH 值, 使 pH 与第一步反应 pH 相同或不同, 但其 pH 范围仍为 6~12, 优选为 7.5~9.5, 再等量加入另一种蛋白, 使交联剂与其活性基团 (该活性基团可以为巯基或氨基) 再继续反应 1~48 小时。

固相介质上的偶联: 介质选用阴离子交换介质或阳离子交换介质, 优选为 DEAE Sepharose Fast Flow、Q Sepharose Big Beads、Q Sepharose Fast Flow、SP Sepharose Fast Flow 以及 CM Sepharose Fast Flow (Amersham pharmacia, Sweden)。用 50mM pH4.0~8.5, 优选为 pH4.5~7.5 的磷酸盐或 HEPES 缓冲液平衡层析介质, 加入 0.5~5mg/ml 的血红蛋白或人血清白蛋白溶液, 使蛋白质首先吸附在介质上。再加

入交联剂，使交联剂与蛋白质的摩尔比为 30: 1~600: 1，优选为 10: 1~500: 1，反应时间 0.1~12 小时，优选为 0.5~10 小时。用上述平衡缓冲液洗柱除去过量的交联剂后，再用含有 0.5 M NaCl 的该缓冲液将带有交联剂的活化的蛋白质洗脱，收集蛋白峰。经 Sephadex G-25 凝胶过滤柱，脱去溶液中的 NaCl。收集含蛋白的洗脱液，超过滤浓缩至蛋白浓度为 1~5mg/ml，加入等摩尔的另外一种蛋白质，同时调节缓冲液 pH 值，使 pH 与第一步反应 pH 相同或不同，其 pH 范围仍为 6~12，优选为 7.5~9.5，使活化的蛋白质交联剂与另外一种蛋白质活性基团(该活性基团可以为巯基或氨基)再继续反应 1~24 小时，可以得到血红蛋白与人血清白蛋白 1: 1 的偶联物。

本发明制备的偶联产物经过离子交换层析、超过滤以及凝胶过滤层析纯化，除去未发生偶联反应及分子量大于 300KD 和小于 100KD 的成分。

将纯化后的偶联产物 pH 值调至 7.4，对于受 2, 3-二磷酸甘油酸影响的血红蛋白，需要向溶液中加入 2, 3-DPG 或磷酸吡哆醛等调节血红蛋白氧亲和力的共价调节剂。终产品其具有良好的血液代用品的特性。

本发明通过以下具体实施例来描述本血液代用品，即血红蛋白与人血清白蛋白偶联物的制备方法。

附图说明

图 1 为纯化后的血红蛋白电泳扫描图谱

A 为血红蛋白溶胀破裂液

B 为纯化后的血红蛋白

图 2 为纯化后的血红蛋白高效凝胶过滤液相色谱

色谱柱为 TSK 3000SW，检测波长 280nm

图 3 为 DEAE Sepharose Fast Flow 阴离子交换法分离纯化偶联物

图 4 为 Superdex 200 凝胶过滤法鉴定偶联物

a 为离子交换法收集的蛋白峰上凝胶过滤柱

b 为反应混合物上凝胶过滤柱

图 5 为 SDS-PAGE 鉴定偶联物图谱

1 为标准分子量蛋白，2 为偶联物，3 为标准牛血清白蛋白，4 为纯化的无基质血红蛋白

图 6 为偶联产物的载氧活性

具体实施方法:

实施例 1: 电泳纯无基质牛血红蛋白的制备

取一定体积洗净的新鲜牛血红细胞, 用两倍体积的冷溶胀液 (含 0.6% NaCl 的 20mmol/L $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ (PBS) 缓冲液, pH7.4) 悬浮, 4℃振荡 1h; 以每分钟溶液总体积 10% 的速度泵入 2 倍红细胞体积的 20mmol/L PBS 缓冲液 (pH7.4), 振荡 1h 后调 NaCl 盐浓度为 0.9%, 即得血红细胞溶胀破裂液。采用 Millipore Pellicon 错流膜过滤系统对破裂液进行预处理。先采用 0.22 μm 膜微滤去除细胞碎片及大分子杂质, 再进一步用截留分子量 10KD 的膜超过滤除去小分子杂质。所得血红蛋白溶液经 DEAE Sepharose Fast Flow 阴离子交换层析进一步纯化。采用 PEG 伴随式层析, 用含有 5% PEG400 的 20mM 磷酸缓冲液, 调节 pH 值为 7.4 进行层析, 收集透过的血红蛋白峰经 SDS-PAGE 电泳检测为一条带 (图 1)。层析的回收率为 97%。操作温度为 10℃。用 HEMOX 血气分析仪检测纯化后的血红蛋白的 50% 氧饱和度 (P_{50}) 为 25.6mmHg, Hill 系数为 2.41。

实施例 2: 色谱纯无基质猪血红蛋白的制备

取一定体积洗净的新鲜猪血红细胞, 用两倍体积的冷溶胀液 (含 0.6% NaCl 的 20mmol/L $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ (PBS) 缓冲液, pH7.4) 悬浮, 4℃振荡 1h; 以每分钟溶液总体积 10% 的速度泵入 2 倍红细胞体积的 20mmol/L PBS 缓冲液 (pH7.4), 振荡 1h 后调 NaCl 盐浓度为 0.9%, 即得血红细胞溶胀破裂液。采用 Millipore Pellicon 错流膜过滤系统对破裂液进行预处理。先采用 0.45 μm 膜微滤去除细胞碎片及大分子杂质, 再进一步用截留分子量 30KD 的膜超过滤除去小分子杂质。所得血红蛋白溶液经 Q Sepharose Big Beads 阴离子交换层析进一步纯化。操作温度为 4℃。采用 PEG 伴随式层析, 用含有 0.5% PEG4000 的 20mM 磷酸缓冲液, 采用 10mM 的磷酸缓冲液, 调节 pH 值为 7.8 进行层析, 收集透过的血红蛋白峰经高效凝胶过滤液相色谱 (HPLC) 检测为单峰 (图 2), 层析的回收率为 95%。

实施例 3: 间-马来酰亚胺苯甲酸-N-羧基琥珀酰亚胺酯 (MBS) 一步交联人血红蛋白与人血清白蛋白

由于 HSA 分子的巯基基团会与 MBS 反应, 从而影响偶联反应。因此, 在用 MBS 活化 HSA 前需要封闭剩余的巯基。向 10 ml 的 5mg/ml HSA 溶液 (pH 7.8 的 HEPES 缓冲液) 缓慢加入 0.2ml 的 30mM 碘代乙酰胺, 室温下反应 20 分钟。随后加入 0.5ml 的 30mM MBS 溶液 (溶于二甲基甲酰胺), 室温下反应 30 分钟。反应混合液通过 Sephadex G-25 凝胶过滤柱, 除去过量的 MBS 和碘代乙酰胺, 收集蛋白组分。因血红蛋白分子有反应活性的巯基基团 (β -93 半胱氨酸的巯基), 活化的 HSA 可直接与血红蛋白分子反应。收集的蛋白组分与 10 ml 的 20 mg/ml 血红蛋白溶液分别充氮气 2 小时, 混合后在氮气保护下于室温反应 2 小时。随后, 加入 0.2 ml 的 30 mM 碘乙酰胺来终止偶联反应。

实施例 4: 乙二醇二缩水甘油醚两步法交联羊血红蛋白与人血清白蛋白

血红蛋白浓度 60mg/ml, 溶液体系为 pH7.5 的 50mM 的 HEPES 缓冲液、溶液总体系为 10ml, 乙二醇二缩水甘油醚与血红蛋白摩尔比为 500:1, 37℃ 水浴摇床反应 10 小时, 通过 Sephadex G-25 凝胶过滤除修饰剂, 换缓冲液为 pH9.5 的 50mM 的硼砂-氢氧化钠缓冲液, 按血红蛋白: 白蛋白 =1: 1 加入白蛋白, 37℃ 水浴摇床反应 48 小时。交联产物经 SDS-PAGE 电泳检测, 结果显示有 83 kD 和 97kD 条带生成。血红蛋白单亚基分子量约为 16kD, 白蛋白分子量为 67kD, 83kD 为单个血红蛋白亚基与血清白蛋白的交联物, 97kD 为交联的两个血红蛋白亚基与一个血清白蛋白的偶联物。说明生成了血红蛋白与血清白蛋白的偶联物。

实施例 5: 戊二醛两步法交联狗血红蛋白与人血清白蛋白

白蛋白浓度 1mg/ml, 溶液体系为 pH7.0 的 50mM 的 HEPES 缓冲液、溶液总体系为 10ml, 戊二醛与白蛋白摩尔比为 100:1, 37℃ 水浴摇床反应 1 小时, 通过 Sephadex G-25 凝胶过滤除修饰剂, 换缓冲液为 pH8.5 的 50mM 的硼酸-硼砂缓冲液, 按血红蛋白: 白蛋白 =1: 1 加入血红蛋白, 37℃ 水浴摇床反应 10 小时。交联产物经 SDS-PAGE 电泳检测, 结果显示有 83 kD 条带生成。血红蛋白单亚基分子量约为 16kD, 白蛋白分子量为 67kD, 83kD 为单个血红蛋白亚基与血清白蛋白的交联物, 说明生成了血

1 2

红蛋白与血清白蛋白的偶联物。

实施例 6: 乙醇醛固相交联马血红蛋白与人血清白蛋白

用 50 mM HEPES 缓冲液 (pH 6.6) 平衡 5 ml Q Sepharose Fast Flow 介质, 与 10 ml 的 2 mg/ml 牛血清白蛋白溶液混合, 使蛋白吸附在介质上。加入乙醇醛, 其与蛋白质的摩尔比为 500: 1, 混匀后在 10℃ 下静置, 并将柱封住。2 小时后用 300 ml 50 mM HEPES 缓冲液 (pH 6.6) 洗柱, 随后改用含有 0.5 M NaCl 的 50 mM HEPES 缓冲液 (pH 6.6) 洗脱, 收集蛋白峰。收集物随后上用 50 mM HEPES 缓冲液 (pH 6.6) 平衡的 Sephadex G-25 凝胶过滤柱, 脱去溶液中的 NaCl。收集含蛋白的洗脱液, 超过滤浓缩至蛋白浓度为 5mg/ml, 加入等摩尔的血红蛋白, 同时调节缓冲液 pH 值 9.5, 使活化的白蛋白所带交联剂与血红蛋白再继续反应 24 小时, 得到两种蛋白质的偶联物。

实施例 7: 戊二醛固相交联牛血红蛋白与人血清白蛋白

用 50 mM 磷酸缓冲液 (pH 8.0) 平衡 5 ml DEAE Sepharose Fast Flow 介质, 与 10 ml 的 5 mg/ml 血红蛋白溶液混合, 使蛋白吸附在介质上。加入戊二醛, 其与蛋白质的摩尔比为 10: 1, 混匀后在 4℃ 下静置, 并将柱封住。0.5 小时后用 300 ml 50 mM 磷酸缓冲液 (pH 8.0) 洗柱, 随后改用含有 0.5 M NaCl 的 50 mM HEPES 缓冲液 (pH 8.0) 洗脱, 收集蛋白峰。收集物随后上用 50 mM HEPES 缓冲液 (pH 8.0) 平衡的 Sephadex G-25 凝胶过滤柱, 脱去溶液中的 NaCl。收集含蛋白的洗脱液, 超过滤浓缩至蛋白浓度为 1mg/ml, 加入等摩尔的白蛋白, 缓冲液 pH 值仍为 8.0, 使活化的血红蛋白的戊二醛醛基与白蛋白再继续反应 8 小时, 得到两种蛋白质的偶联物。

实施例 8: 偶联产物的纯化

用 300KD 和 100KD 的超滤膜除去聚合产物中大于 300KD 和小于 100KD 的成分, 所得产物为分子量分布在 100KD ~ 300KD 之间的偶联产物, 即 1~3 个已经分子内交联或未分子内交联的血红蛋白与 1~3 个人血清白蛋白分子的偶联物。

实施例 9: 偶联产物的纯化

将实施例 6 中偶联产物的 pH 值调至 7.0, 上 DEAE Sepharose Fast Flow 阴离子交换层析柱, 该柱已用含有 0.1 M NaCl 的 50 mM HEPES 缓冲液 (pH 7.0) 平衡。用 25 ml 平衡液洗脱, 流速为 0.5 ml/min。随后改用 55 ml 含有 0.1-0.5 M NaCl 的 50 mM HEPES 缓冲液 (pH 7.0) 洗脱, 流速为 0.5 ml/min。洗脱液在 280 nm 下检测, 图谱见图 3。收集含有偶联物的蛋白峰, 浓缩后上 Superdex 200 凝胶过滤柱。以 50 mM HEPES 缓冲液 (pH 7.0) 为流动相, 流速为 0.35 ml/min。洗脱后在 280 nm 下检测出现两个洗脱峰, 其中偶联物在第一个洗脱峰 (图 4), 收集用 SDS-PAGE 凝胶电泳进一步鉴定 (图 5)。纯化的偶联物主要含两条蛋白带 (第 2 泳道), 分子量约为 16 kDa 和 83kDa。这是由于血红蛋白为四聚体蛋白, 加入上样缓冲液煮沸后, 解聚为 16 kDa 的亚基。而血红蛋白与 HSA 偶联后, 四聚体蛋白中的 3 个亚基解离出来, 而剩下的 1 个亚基与 BSA 分子结合为分子量 83 kDa 的蛋白。因此, 可确定该蛋白为 1:1 结合的 HSA-血红蛋白偶联物。

实施例 10: 本血液代用品成品制得及特性

将纯化后的偶联产物的 pH 值调至 7.4。对于受 2, 3-二磷酸甘油酸影响的血红蛋白, 需要向溶液中加入 2, 3-DPG 或磷酸吡哆醛等调节血红蛋白氧亲和力的共价调节剂。实施例 7 中偶联产物用 HEMOX 血气分析仪检测纯化后的血红蛋白的 P_{50} 为 26.8mmHg, Hill 系数为 2.30 (图 6)。

成分	特性	成分	特性
Hb-HSA	12 (g%)	Cl ⁻	110 ~ 125mM
Hb-HSA 分子量	100 ~ 300KD	Na ⁺	136mM
MetHb	<5%	K ⁺	3.2 ~ 4.2mM
P ₅₀	25 ~ 30mmHg	Ca ⁺⁺	2.0mM
Hill 系数	1.90 ~ 2.30	Mg ⁺⁺	1mM
pH	7.4	HCO ₃ ⁻	25mM
晶体渗透压	300 ~ 320mOsm	HPO ₄ ⁻	0.5mM
病毒	阴性	HPO ₄ ²⁻	0.5mM
细菌	阴性	SEB	2mM
致热源	阴性	粘度	3.0 ~ 8.0mPa.s (切变率高、中、低)
脂质	阴性		
杂蛋白	阴性	GSH 或其它巯基供体	适量

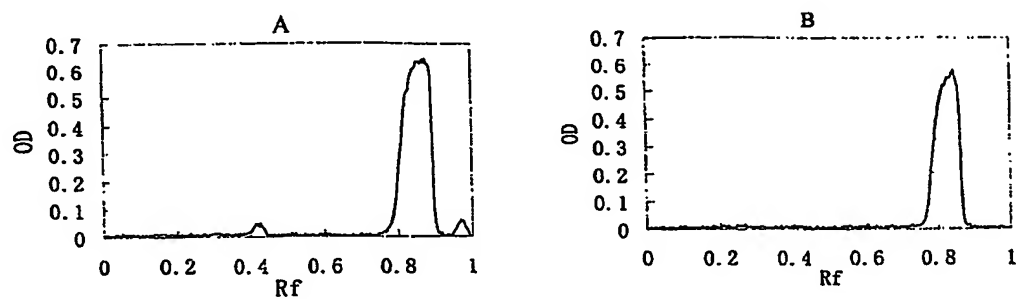


图 1 纯化后的血红蛋白电泳扫描图谱

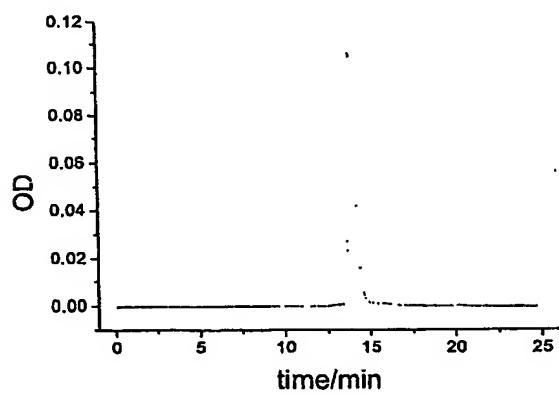


图 2 纯化后的血红蛋白高效凝胶过滤液相色谱

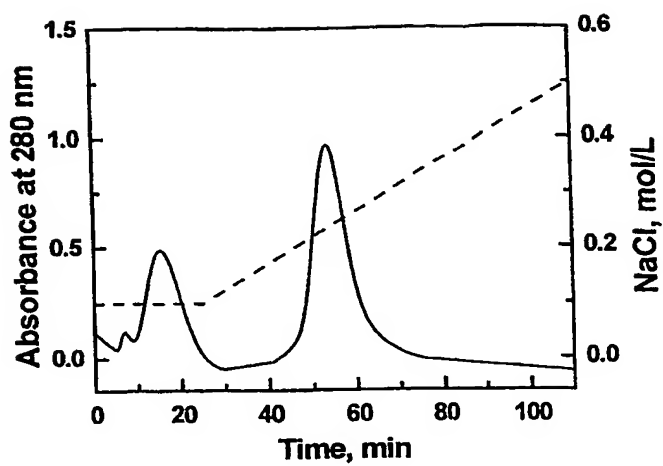


图 3 DEAE Sepharose Fast Flow 阴离子交换法分离纯化偶联物

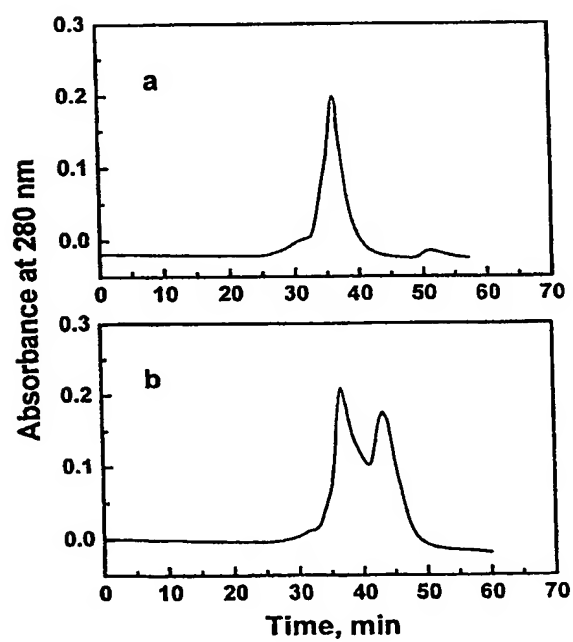


图 4 Superdex 200 凝胶过滤法鉴定偶联物

BEST AVAILABLE COPY

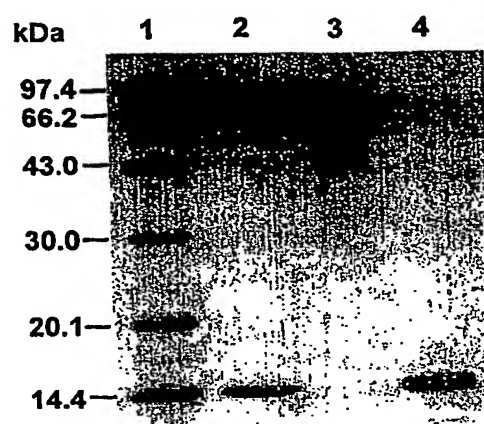


图 5 SDS-PAGE 鉴定偶联物

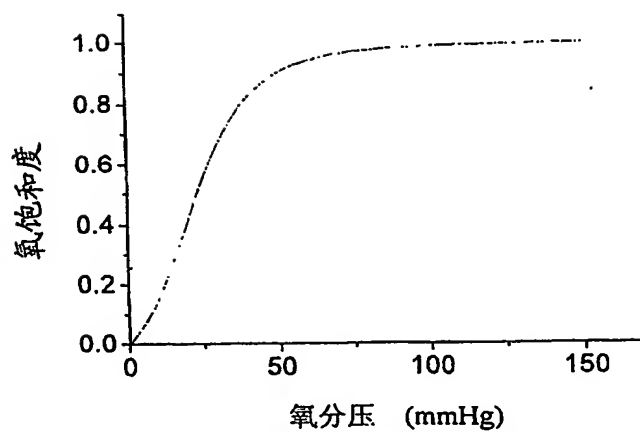


图 6 偶联产物的载氧活性